

·实验研究 Experimental research·

急性缺血性脑卒中介入取栓器血栓模型的机械特性比较

罗中华, 宦 怡, 贺洪德, 孙立军, 张学昕, 张文龙

【摘要】 目的 比较用于评估治疗急性缺血性脑卒中的介入取栓器械的血栓模型。为介入机械取栓器械的研制、评估提供更为科学的血栓模型。**方法** 复制 Kan 及 Gralla 的可透 X 线血栓模型, 自制聚氯乙烯管内自发凝固成型可透 X-线红色血栓模型 (spontaneous non-radiopaque tube red clots, SNTR) 及聚氯乙烯管内自发凝固成型可透 X-线的白色血栓模型 (spontaneous non-radiopaque tube white clots, SNTW)。用弹性实验, 拉伸实验评价比较血栓模型的机械力学性能。用 HE 染色评价血栓模型的组织结构。**结果** 制备出 SNSW (Kan 模型)、TNTR (Gralla 模型)、SNTR 及 SNTW 4 种机械特性完全不同的可透 X-线血栓模型, 在 24 h 及 1 和 2 周的弹性实验 (度) 结果分别为 SNSW: 5.00 ± 4.47 , 4.16 ± 3.76 , 5.83 ± 6.64 ; TNTR: 19.33 ± 6.05 , 16.66 ± 4.08 , 19.16 ± 9.70 ; SNTR: 10.00 ± 7.07 , 7.50 ± 6.89 , 13.33 ± 4.08 ; SNTW: 87.5 ± 2.73 , 81.66 ± 6.83 , 88.33 ± 4.08 。拉伸实验 (cm) 的结果分别为 SNSW: 4.43 ± 0.38 , 4.67 ± 0.29 , 4.60 ± 0.31 ; TNTR: 3.79 ± 0.13 , 3.91 ± 0.11 , 3.91 ± 0.16 ; SNTR: 3.25 ± 0.15 , 3.46 ± 0.10 , 3.33 ± 0.27 ; SNTW: 4.22 ± 0.18 , 4.40 ± 0.32 , 4.11 ± 0.15 。**结论** SNSW, TNTR, SNTR 及 SNTW 为 4 种机械性能不同的血栓模型, 根据研究目的及器械的取栓原理从 4 种血栓模型中选用或联合其中几种评估介入取栓器械的效能更为合理。

【关键词】 急性缺血性脑卒中; 介入治疗; 机械取栓器械; 血栓模型

中图分类号: R743.3 文献标志码: B 文章编号: 1008-794X(2013)-04-0317-05

Comparison of mechanical characteristics of blood clot models used for the evaluation of interventional thrombectomy devices for acute stroke LUO Zhong-hua, HUAN Yi, HE Hong-de, SUN Li-jun, ZHANG Xue-xin, ZHANG Wen-long. Department of Radiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: LUO Zhong-hua, E-mail: lzh111@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To compare the mechanical characteristics of blood clot models used for the evaluation of interventional thrombectomy devices for acute stroke, and to provide more scientific blood clot models for the manufacture of interventional thrombectomy devices. **Methods** The Kan's and Gralla's radiopaque tube clots model was duplicated. The spontaneous radiopaque tube red clots (SNTR) and spontaneous radiopaque tube of white clots (SNTW) were prepared. By bending testing and elongation testing the mechanical properties of clot models were evaluated. By using HE staining the organizational structure of the clot models was assessed. Software SAS9.3 was used to analyze the data. **Results** SNSW (Kan model), TNTR (Gralla model), SNTR and SNTW were successfully prepared. The bending testing of the four radiopaque clot models that carried quite different mechanical properties was separately performed at 24 hours, one and two weeks later. The results showed that the elasticity of SNSW was (5.00 ± 4.47), (4.16 ± 3.76) and (5.83 ± 6.64) degree respectively; the elasticity of TNTR was (19.33 ± 6.05), (16.66 ± 4.08) and (19.16 ± 9.70) degree respectively; the elasticity of SNTR was (10.00 ± 7.07), (7.50 ± 6.89) and (13.33 ± 4.08) degree respectively; and the elasticity of SNTW was (87.5 ± 2.73), (81.66 ± 6.83) and (88.33 ± 4.08) degree respectively. The elongation testing of the four radiopaque clot models that carried quite different mechanical properties was separately performed at 24 hours,

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2013.04.013

作者单位: 710032 西安 第四军医大学西京医院放射科

通信作者: 罗中华 E-mail: lzh111@fmmu.edu.cn

one and two weeks later. The results showed that the stretch limit of SNSW was (4.43 ± 0.38) , (4.67 ± 0.29) and (4.60 ± 0.31) cm respectively; the stretch limit of TNTR was (3.79 ± 0.13) , (3.91 ± 0.11) and (3.91 ± 0.16) cm respectively; the stretch limit of SNTR was (3.25 ± 0.15) , (3.46 ± 0.10) and (3.33 ± 0.27) cm respectively; the stretch limit of SNTW was (4.22 ± 0.18) , (4.40 ± 0.32) and (4.11 ± 0.15) cm respectively. **Conclusion** SNSW, TNTR, SNTR and SNTW are four clot models with different mechanical properties. It is reasonable that the use of one proper clot model or some of these clot models should be based on the purpose of the study. (J Intervent Radiol, 2013, 22: 317-321)

【Key words】 acute ischemic stroke; interventional therapy; mechanical thrombectomy devices; clot model

介入机械取栓治疗急性缺血性脑卒中具有能提高再通率、迅速重建血运等优点,目前已成为治疗急性缺血性脑卒中的主要选择及研究热点^[1-2]。在美国,已有几种介入器械用于临床治疗急性缺血性脑卒中。已有更多的介入取栓器械正在研制或进入临床前试验。这些器械在研制过程及临床使用前,一般均在体外模型或动物体内评估其安全性及有效性^[3-5]。故有能准确模拟患者条件的模型是关键。器械评估研究的评估参数多为取栓次数、取出血栓多少及远端分支再栓塞多少等^[3-7]。但所有的这些评估参数均与血栓模型的机械特性密切相关。这一点在介入取栓器械的评估系统中通常被忽视。也鲜有关于血栓模型的机械特性的研究,本文比较目前较常用的我们自制的血栓模型的机械特性,为相关研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物准备

实验用猪 6 头,体重 40 ~ 55 kg,作为供血者,其中 1 头专门用于本实验,5 头还用于其他实验,血液在动物肝素化之前从股动脉获得。肌注麻醉动物后,穿刺股动脉(一般为右侧)后,插入 7 F 鞘,所需血液均从由鞘抽取。

1.2 血栓模型的制备

1.2.1 血栓模型的类型 本实验中共制备及检测 4 种血栓模型,分别有 Kan 等^[8]注射器内自发凝固成型的可透 X-线白色血栓模型(spontaneous non-radiopaque syringe white clots, SNSW), Gralla 等^[9]的聚氯乙烯管内凝血酶诱导凝固成型可透 X-线红色血栓模型(thrombin induced non-radiopaque tubing red clots, TNTR), 我们自己的聚氯乙烯管内自发凝固成型可透 X-线红色血栓模型(spontaneous non-radiopaque tube red clots, SNTR)和聚氯乙烯管内自发凝固成型可透 X-线的白色血栓模型(spontaneous

non-radiopaque tube white clots, SNTW)。

1.2.2 SNTR 及 SNTW 的制备 先将聚氯乙烯软管(长 160 cm, 内径 4 mm)盘绕成一个直径约 15 cm 的圆圈, 将其一端经三通和股动脉血管鞘相连。管末端略抬高(防止气泡留于管内), 打开三通, 让动脉血自动流入管内。当动脉血液充满后封闭管两端。装满血液的管圈以 25°角斜置, 以便含纤维蛋白(白色)和红细胞层(红色)分离, 也利于血浆成分保留于白色血栓中。然后室温(22℃)孵育 1 h, 随后存放于冰箱(4℃)内, 24 h 后测试。

1.2.3 SNSW 的制备(KAN) 用 20 ml 注射器从血管鞘吸满血液后, 室温下水平放置 2 h, 待大部分红细胞沉淀, 红细胞层和富有纤维蛋白层明显分离, 再用镊子小心取出血栓, 用手术刀切除红细胞层, 留下剩余的血块(白色为主), 然后纵向切成两半, 用注射器将其吸入聚氯乙烯软管内成型。随后存放于冰箱(4℃)备用。

1.2.4 TNTR 的制备 先将凝血酶 0.5 ml (50 u) 与 20 ml 血液混合后注射到聚氯乙烯软管(长 160 cm, 内径 4 mm)内。然后盘绕成直径约 15 cm 的圆圈水平放置。室温(约 22℃)孵育 2 h, 随后用于测试或存放于冰箱(4℃)备用。

1.3 血栓模型机械性能检测

所有用于实验的血栓, 先用注射器及生理盐水将血栓冲出, 放入装有生理盐水的盆中, 后切成 2 cm 长。实验前 20 ~ 30 min, 血栓保存于生理盐水中。进行弹性测试, 拉伸测试。每种血栓的测试均重复 10 次。测试的时间点为孵育后 2 h、1 d、1 周及 2 周。

1.3.1 弹性弯曲实验 这一实验反映血栓弯曲后回复原状的能力。实验过程: 室温下, 在光滑的玻片下放 1 个量角器, 在玻片上滴几滴生理盐水, 将血栓放置玻片上。用 2 个小镊子将血栓弯曲 90°。然后释放血栓的一端, 看血栓能回复到什么位置, 记下回位的角度。

1.3.2 拉伸实验 这一实验用于测试血栓抗拉强度。室温下,将血栓置于光滑的玻璃表面,用 2 个镊子夹住血栓的两端,慢慢拉长,直到血栓断开(KAN)。用尺子测量拉伸长度并记录。1 个脆弱的血块通常在只能拉伸其 0.5 倍长度便断开。坚固而有弹性的血块,能拉伸到其长度的 1 倍以上。

1.4 血栓模型的组织学评价

每种血栓模型随机抽取 2 个样本,分别保存在 4% 甲醛溶液中送组织学检查。标本用石蜡包埋,切片,行 HE 染色

1.5 统计分析

用 Microsoft Excel(Office 2007)收集所有数据。用 SAS9.3 软件统计分析数据。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,进一步的两两比较采用 Tukey-Kramer adjustment 分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SNTW 和 SNTR 的测试

由于血液在封闭的管内自发凝血相当缓慢,2 h 后,坚实的血栓尚未形成,故 SNTW 和 SNTR 的首

次测试于 24 h 后进行。SNTW 外观表现略细于其他血栓,乳白色的主体一侧有纵向红色条纹(图 1),其外观在 24 h、1 周和 2 周无明显改变。它们柔软而有弹性,用镊子夹时,不易损伤。

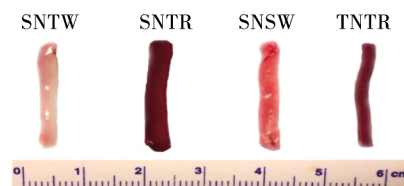
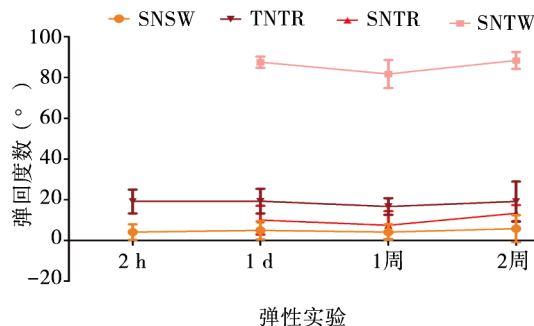
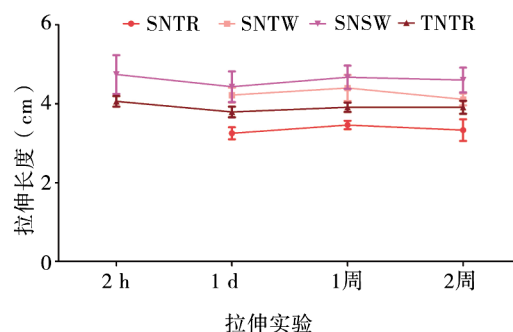


图 1 血栓模型的大体外观

弯曲试验中,SNTW 几乎没有弹性,表现出其可塑性,在 24 h、1 周和 2 周的回复度数($^{\circ}$)分别为 87.5 ± 2.73 , 81.66 ± 6.83 , 88.33 ± 4.08 (图 2a);拉伸长度(cm)在所有 3 个时间点相似,其在 24 h、1 周和 2 周分别为 4.22 ± 0.18 , 4.40 ± 0.32 , 4.11 ± 0.15 (图 2b)。SNTR 呈暗红色,软,镊子夹时易破碎损伤,在生理盐水中易洗涤出红细胞;弯曲试验显示其弹性良好,在 24 h、1 周和 2 周的回复度数($^{\circ}$)分别为 10.00 ± 7.07 , 7.50 ± 6.89 , 13.33 ± 4.08 ;能拉伸的最长长度(cm)在 24 h、1 周和 2 周分别为 3.25 ± 0.15 , 3.46 ± 0.10 , 3.33 ± 0.27 。



2a 4 种不同血栓的弹性实验



2b 4 种不同血栓的拉伸实验

图 2 4 种不同血栓的拉弹性和拉伸实验结果

2.2 SNSW 的测试

SNSW 的颜色偏红,随存放时间变长而变暗,是所有血栓模型中最为坚固的血栓,用镊子夹时很难损害。弯曲试验中,SNSW 很快就回升到原来的形状,在 2 h、24 h、1 周和 2 周的回复度数($^{\circ}$)分别为 4.16 ± 3.76 , 5.00 ± 4.47 , 4.16 ± 3.76 , 5.83 ± 6.64 ;伸长率测试中,表现出相当大的拉伸强度,能拉伸其原来长度的 2 倍以上,在 2 h、24 h、1 周和 2 周的能拉伸的最长长度(cm)分别为 4.74 ± 0.49 , 4.43 ± 0.38 , 4.67 ± 0.29 , 4.60 ± 0.31 。

2.3 TNTR 的测试

TNTR 的血块较细,色暗红,中等硬度,镊子夹

时不易破碎。TNTR 在弯曲试验中显示出良好的弹性,在 2 h、24 h、1 周和 2 周的回复度数($^{\circ}$)分别为 19.16 ± 5.84 , 19.33 ± 6.05 , 16.66 ± 4.08 , 19.16 ± 9.70 ;能拉伸的最长长度(cm)分别为 4.06 ± 0.13 , 3.79 ± 0.13 , 3.91 ± 0.11 , 3.91 ± 0.16 。

比较 SNSW, TNTR, SNTW 及 SNTR 的弹性实验及拉伸实验的结果,可知它们是机械性能完全不同的血栓模型(图 3)。

2.4 组织学评价

4 种血栓模型的组织学结构完全不同。TNTR 显示大量的红细胞和少量的纤维结构紧密,分布均匀。SNSW 显示大量的纤维蛋白和少量的红细胞及

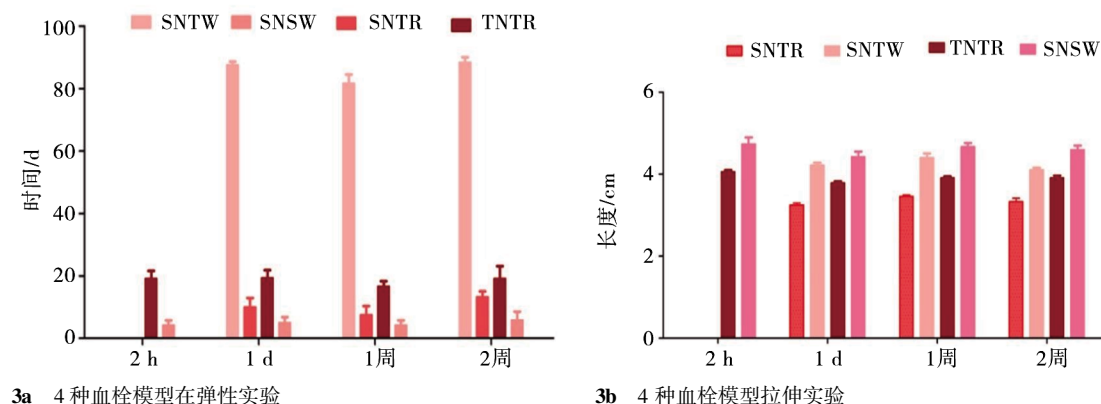


图 3 4 种血栓的性机械力学特性

有核细胞。SNTR 略松散, 大量红细胞均匀分布。SNTW 显示中量纤维蛋白和少量的红细胞及有核细胞松散的分布(图 4)。

3 讨论

引起急性缺血性脑卒中患者的血栓, 由于其构

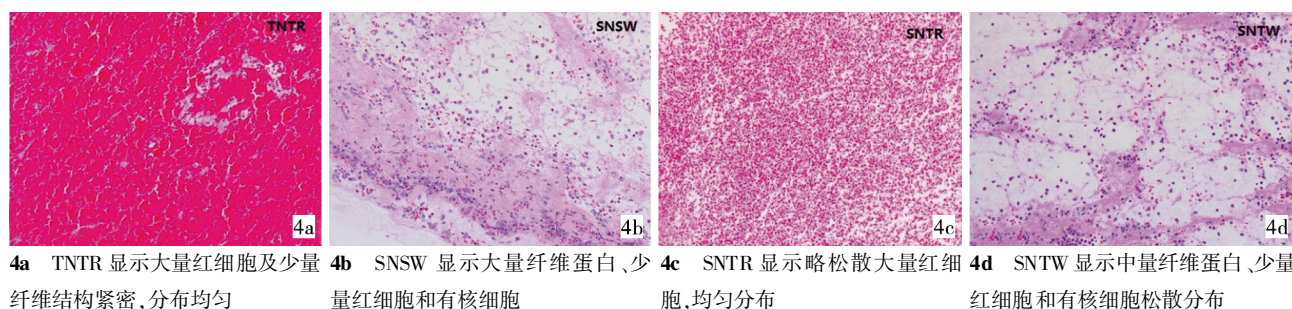


图 4 4 种血栓模型的组织学所见(HE, × 20)

成的不同, 不难理解其机械性能多样性。血栓机械性能的多样性可取决于其来源, 如心源性的血栓及颈动脉来源血栓可能不一样。大多数颈动脉血栓粘附于管腔, 是潜在的诱发脑卒中的栓子。位于纤维帽下的颈动脉血栓, 虽然可能不大, 但仍可因纤维帽及斑块破裂, 其内容物可能会导致动脉-动脉栓塞。血栓模型作为临床前评估介入取栓器械, 其力学性能可影响改变设备器械的性能。故使用具有代表性的血块模型可能有助于改善取栓装置的临床前评价的预测能力。同时, 建立临床前实验用脑卒中模型最主要的挑战是难以复制出引起急性缺血性脑卒中患者的栓塞血栓。而建立一个跨度大范围的刚度和弹性血栓模型系列测试这些设备, 可能是解决评估介入取栓器械及技术的一个方向。虽然, 每种血栓模型的组成和结构均不能代表复杂的患者血栓, 但能代表复杂的具不同机械性的患者血栓。为了解决这一问题, 我们通过不同制备方法, 制成硬度和弹性不同的血栓模型。就制备方法而言, 这几种方法简单有效, 易重复。相对其他, SNSW 的制备较为复杂, 需要人工分离白色血栓。而 SNTR 和 SNTW 的制备要注意放置角度, 我们在尝试过多

个角度后发现小角分离即可分出红白血栓(重力作用使红细胞下沉分离), 而 25°较为理想, 即能分离出红白血栓, 又不影响血栓的质量。需要注意的是, 一旦红白血栓分离后(室温下约 1 h)应立即放入冰箱内(温度可能影响白色血栓的含水量, 从而影响其结构)。

目前, 对血栓模型的机械特性研究很少, 而且用于估评血栓模型机械特性的方法也不多。Frank 用弹性测试区分血栓机械特性(硬软血栓), Kan 等^[8]用拉伸测试比较不同血栓间的区别。Chueh 等^[10]用动态机械分析仪比较血栓模型与患者血栓的机械性质。但每种方法都有其优缺点, 动态机械分析仪应该更具客观性, 但由于其标本的大小就应变所需的力量有限制, 不能整体全面的评价血栓。而拉伸测试及弹性测试相对简单, 虽然是人工操作, 相比动态机械分析仪可能缺乏客观性, 但两者联合应用能准确地反映血栓的机械力学特性, 其优点是能测量较长的整体血栓。我们借用这两种方法评价血栓的机械特性, 能更全面、更准确地评估血栓。同时, 我们还评价了时间对血栓机械性的影响, SNTW 及 SNTR 在 1 周时弹性略有增加, 但我们认为时间对

血栓机械性的影响不明显。Chueh 等^[10]的研究发现深颜色的陈旧血栓结构紧凑,这些血栓缺乏弹性和容易碎裂(为 DMA 和 SEM 分析制备样品期间观察到),这可能与陈旧血栓的蛋白降解有关。对于陈旧血栓,介入机械取栓时遇到的阻力小。从急性缺血性脑卒中患者取出的鲜红色血栓,柔软而富有弹性,与陈旧血栓相比,新鲜血栓不容易碎。但从我们的拉伸结果来看,SENTW 及 SENTR 在 1 周时能拉伸的最长长度略有增加,这一点与 Chueh 等^[10]的血栓不同,我们认为自发凝固而成的血栓,其纤维蛋白成熟需要一定时间,可能 1 周正是纤维蛋白形成的最好时间。Chueh 等^[10]曾用动态机械分析仪分析部分常用模型与脑卒中患者血栓的机械力学性能,但他们分析样本的机械性能时所用的标本尺寸太小,仅 1~2 mm,难以反映整体血栓的机械性能。而弹性实验及拉伸实验更能反映整体血栓的机械力学性能。从模型的组织结构看,4 种血栓模型的组织结构完全不同,其中 SNSW 更类似大部分患者的血栓标本,即大量的纤维蛋白及少量的红细胞^[10],但其结构略松散。

总之,我们应用简单的方法制备出 4 种机械性能(硬度和弹性)及结构成分不同的血栓。其机械性能类似缺血性脑卒中患者的血栓样本。时间对血栓机械性的影响虽然不是很明显,但有随时间延长,血栓弹性下降的趋势。我们认为根据研究的目的及器械的取栓原理,从 4 种血栓模型选用或联合其中几种评估介入取栓器械的效能更为合理。

[参考文献]

[1] Nogueira RG, Schwamm LH, Hirsch JA. Endovascular appro-

aches to acute stroke, part 1: Drugs, devices, and data [J]. Am J Neuroradiol, 2009, 30: 649 - 661.

- [2] 齐立,李慎茂,俸军林,等. 动脉溶栓与机械碎栓联合动脉溶栓的对比分析[J]. 介入放射学杂志, 2012, 21: 180 - 184.
- [3] Gralla J, Schroth G, Remonda L, et al. Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: thrombus - device interaction, efficiency, and complications in vivo [J]. Stroke, 2006, 37: 3019 - 3024.
- [4] Brekenfeld C, Schroth G, El-Koussy M, et al. Mechanical thromboembolism for acute ischemic stroke: comparison of the catch thrombectomy device and the Merci Retriever in vivo [J]. Stroke, 2008, 39: 1213 - 1219.
- [5] Mordasini P, Frabetti N, Gralla J, et al. In vivo evaluation of the first dedicated combined flow - restoration and mechanical thrombectomy device in a swine model of acute vessel occlusion [J]. Am J Neuroradiol, 2011, 32: 294 - 300.
- [6] Krueger K, Deissler P, Coburger S, et al. How thrombus model impacts the in vitro study of interventional thrombectomy procedures [J]. Invest Radiol, 2004, 39: 641 - 648.
- [7] Müller-Hülsbeck S, Grimm J, Leidt J, et al. Comparison of in vitro effectiveness of mechanical thrombectomy devices [J]. J Vasc Interv Radiol, 2001, 12: 1185 - 1191.
- [8] Kan I, Yuki I, Murayama Y, et al. A novel method of thrombus preparation for use in a swine model for evaluation of thrombectomy devices [J]. Am J Neuroradiol, 2010, 31: 1741 - 1743.
- [9] Gralla J, Schroth G, Remonda L, et al. A dedicated animal model for mechanical thrombectomy in acute stroke [J]. Am J Neuroradiol, 2006, 27: 1357 - 1361.
- [10] Chueh JY, Wakhloo AK, Hendricks GH, et al. Mechanical characterization of thromboemboli in acute ischemic stroke and laboratory embolus analogs [J]. Am J Neuroradiol, 2011, 32: 1237 - 1244.

(收稿日期:2012-10-15)

(本文编辑:侯虹鲁)